

**ÉTUDE DES SUBSTANCES SOLUBLES FORMÉES AU COURS
DE LA RÉACTION DE LA PRÉSURE SUR LA CASÉINE α .**

**II. — COMPOSITION CHIMIQUE.
FRACTIONNEMENT PAR L'ACIDE TRICHLORACÉTIQUE.**

*Institut de Biochimie, Faculté des Sciences, Orsay (S. et O.), France.
Laboratoire de Chimie biologique, Faculté des Sciences, 96 Bld Raspail, Paris (6^e).*

INTRODUCTION.

Dans le précédent mémoire, nous avons montré qu'après la réaction de la présure sur la caséine α , plusieurs substances se trouvaient dans la partie soluble, à pH 6,8. L'une de ces substances forme plus de 80 p. 100 du total soluble et 20 p. 100 de la caséine α originelle ; il s'agit probablement du caséino-glycopeptide précédemment étudié [1, 2] et qui est séparé par l'acide trichloracétique à 12 p. 100. Des constituants mineurs peuvent être séparés par électrophorèse et par chromatographie ; leur origine et leur rôle sont mal connus. Nous avons cherché à les préciser en déterminant leur composition en acides aminés et en glucides. Nous avons d'autre part, étudié l'influence du mode de préparation sur la composition du caséino-glycopeptide.

MATÉRIEL ET MÉTHODES.

1) Préparation des produits solubles de la réaction.

Elle a été décrite dans le précédent mémoire, ainsi que le fractionnement par électrophorèse sur papier et par chromatographie sur colonnes d'échangeurs d'ions (DEAE-cellulose et DEAE-Sephadex). Le constituant correspondant au caséino-glycopeptide a été désigné par S_1 ; les constituants mineurs, par S_2 (neutre), S_3 et S_4 (basiques). Les fractions électrophorétiques sont obtenues par élution de nombreuses bandes au moyen de l'acide acétique 0,2 N et les fractions chromatographiques par élution au moyen de la solution tampon pyridine 0,2 M, acide acétique, eau, à pH 6,5 et 5,0.

2) Méthodes analytiques.

On a dosé l'azote par micro-Kjeldahl, le phosphore par la méthode de BEREMBLUM et CHAIN [3], les osamines par celle de RONDLE et MORGAN [4], les sucres neutres par celle de SCHULTZE et coll. [5] et l'acide sialique par la méthode de WARREN [6].

Les sucres ont été libérés par une hydrolyse de 3 heures à 100° avec HCl N pour les sucres neutres et HCl 2 N pour les sucres aminés. L'acide sialique a été libéré par une hydrolyse de 1 heure à 85° avec H₂SO₄ 0,1 N.

La détermination quantitative des acides aminés, après hydrolyse acide totale (HCl 6 N, 18 heures, 110° en tube scellé), a été effectuée par l'autoanalyseur « Technicon », en suivant la technique d'élution de PIEZ et MORRIS [7].

3) Action de l'acide trichloracétique (TCA).

La solution à 1 p. 100 des substances solubles totales est additionnée d'un égal volume d'une solution à 24 p. 100 d'acide trichloracétique. Le surnageant est séparé par centrifugation ; il est traité par l'éther jusqu'à disparition de l'acide trichloracétique et finalement les substances sèches sont obtenues par lyophilisation.

RÉSULTATS.

1) Composition en acides aminés.

Le Tableau I présente la composition du constituant dominant S₁, préparé soit par électrophorèse sur papier (S_{1-E}), soit par chromatographie sur DEAE-cellulose (S_{1-C}). Pour comparaison, nous avons fait figurer dans ce tableau le caséino-glycopeptide trichloracétique [1].

Les deux fractions S_{1-E} et S_{1-C} possèdent les caractéristiques analytiques qui distinguent nettement le caséino-glycopeptide de la caséine α et du produit insoluble de la réaction, la paracaséine α : absence des acides aminés aromatiques et soufrés, de l'arginine et de l'histidine ; excès de l'isoleucine par rapport à la leucine, etc... Les rapports moléculaires calculés sur la base Gly et Leu = 1, sont très proches, dans le caséino-glycopeptide et dans la fraction chromatographique S_{1-C}. Avec la fraction électrophorétique la concordance est un peu moins étroite.

En ce qui concerne les fractions mineures, nous avons obtenu des résultats moins précis en raison des très petites quantités de substances purifiées dont nous disposions, et moins significatives, en raison de la difficulté que nous avons éprouvée à séparer complètement les fractions S₂, S₃ et S₄.

Le Tableau II présente les résultats concernant les fractions électropositives, S₃ et S₄, qui sont les mieux individualisées. Les rapports moléculaires ont été calculés en prenant pour unité la tyrosine dans

TABLEAU I.
Composition en acides aminés de la fraction S_1 .

p. 100 de la partie peptidique.
r = rapports moléculaires.

Acide aminé	S_1 (E)		S_1 (C)		C. G. P.	
	P. 100	r	P. 100	r	P. 100	r
Asp	8,5	4	7,9	4	8,15	4
Thr	16,5	8	19,5	11	16,1	9
Ser	8,1	5	8,5	6	9,8	6
Glu	19,8	8	20	9	19,8	9
Pro	15,9	8	13,9	8	11,15	7
Gly	2,0	1	1,2	1	1,2	1
Ala	5,2	3	5,2	4	6,5	5
Val	6,75	3	7,55	4	8,35	5
Ileu	7,2	3	8,1	4	9,7	5
Leu	2,2	1	2,25	1	2,1	1
Lys	7,4	3	5,5	3	6,4	3
His, Phe, } Cys, Tyr, } Arg	0	—	0	—	0	—

S_1 (C) : S_1 préparé par chromatographie sur DEAE-cellulose.

S_1 (E) : S_1 préparé par élution après ionophorèse sur papier.

C.G.P. : caséino-glycopeptide [1].

S_3 et la cystine dans S_4 . Il n'y a pas de cystine dans S_3 et la proportion de tyrosine dans S_4 est trop forte pour être prise comme unité ; cela conduirait à un poids moléculaire trop élevé pour un fragment de la caséine α .

Les deux constituants S_3 et S_4 n'ont pas la même composition en acides aminés. Ils contiennent des acides aminés aromatiques et de l'histidine, ce qui les distingue du caséino-glycopeptide ; en outre, S_4 contient de la cystine. La présence de ces acides aminés rapproche ces deux constituants de la caséine α [8] et de la paracaséine α [9], dont les rapports moléculaires ont été mentionnés dans le Tableau II ; cependant ils ne contiennent que des traces d'arginine et la comparaison des rapports moléculaires ne révèle pas d'autres similitudes entre ces substances.

Une analyse qualitative de la fraction S_2 n'a pas révélé la présence des acides aminés aromatiques.

2) Composition de la partie non-peptidique.

Nous avons analysé les fractions préparées par chromatographie d'une part S_1 , et d'autre part, le mélange des fractions mineures S_2 , S_3 et S_4 ; le Tableau III présente les résultats ; nous avons également mentionné les valeurs obtenues à partir des substances solubles totales, du caséino-glycopeptide et de la caséine α .

TABLEAU II.
Composition en acides aminés des fractions S₂ et S₄,
p. 100 de la partie peptidique.
r = rapports moléculaires.

Acides aminés	S ₂		S ₄		Caséine x [8] r	Paracaséine x [9] r
	p. 100	r	p. 100	r		
CySO ₃ H.....	—		5,5			
Asp.....	10,0	8	7,1	7	17	13
Thr.....	8,8	8	8,2	9	17	7
Ser.....	5,1	5	5,3	6	18	13
Glu.....	16,5	12	27,6	24	36	28
Pro.....	8,1	7	13,8	15	23	17
Gly.....	3,1	4	1,8	3	5	4
Ala.....	6,3	7	2,8	4	18	14
Cys.....	—			1	1	2
Val.....	3,8	3	2,8	3	13	10
Met.....	tr (?)		tr.		2	2
Ileu.....	7,7	6	2,1	2	14	10
Leu.....	6,7	5	4,7	4	14	12
Tyr.....	1,8	1	4,0	3	13	13
Phe.....	3,25	2	2,6	2	8	6
Lys.....	14,0	10	8,1	7	12	12
His.....	5,0	3	2,9	3	3	4
Arg.....	tr.		tr.		7	7
Try.....	?		+		1 à 2	1 à 2

tr : traces.

TABLEAU III.
Composition de la partie non-peptidique.
(en p. 100 de substance sèche).

	Osamines	Oses	Acide sialique (*)	Phosphore
Fraction S ₁	3,0	2,5	5,0	0,25
Fractions S ₂ + S ₃ + S ₄ ...	0	1,9	0	0
Total soluble.....	2,6	2,2	4,0	0,31
Caséino-glycopeptide.....	6,5	6,0	10,2	0,41
Caséine z.....	1,4	1,3	2,2	0,21

(*) En acide N-acétylneuraminique.

La fraction S₁ contient les trois composants glucidiques trouvés dans le caséino-glycopeptide, ainsi que le phosphore, mais ils sont en plus faibles proportions que dans ce dernier. Au contraire, les fractions mineures sont dépourvues d'osamine, d'acide sialique et de phosphore ; elles contiennent des oses, mais il est probable que la valeur donnée est trop élevée ; en effet, la chromatographie sur papier d'un

hydrolysat a révélé la présence d'impuretés glucidiques provenant probablement de la colonne de chromatographie. Au point de vue de la composition de la partie non-peptidique, les fractions S₂, S₃ et S₄ n'ont rien de commun avec le caséino-glycopeptide ni avec la caséine α .

3) *Action de l'acide trichloracétique sur les substances solubles.*

Le caséino-glycopeptide, préparé par l'intermédiaire de l'acide trichloracétique et la fraction chromatographique correspondante, S₁, n'ont pas exactement la même composition en glucides et en phosphore ; de plus, ils sont obtenus en proportions différant du simple au double. L'acide trichloracétique provoque donc un fractionnement des substances solubles : nous avons cherché à le préciser.

Dans une solution à 1 p. 100 des substances solubles totales, additionnée d'acide trichloracétique pour atteindre la concentration finale de 12 p. 100, un précipité abondant se forme ; il représente 40 p. 100 de la substance initiale. L'examen électrophorétique de la partie insoluble et de la partie soluble révèle l'existence des quatre constituants précédemment observés ; mais, avec la partie insoluble, il reste de la substance au point de départ.

Le même traitement appliqué à la fraction chromatographique S₁, provoque la précipitation de 40 p. 100 également de la substance ; or, cette fraction était électrophorétiquement homogène.

Le caséino-glycopeptide peut se trouver aussi bien dans le surnageant que dans le précipité, mais les deux parties n'ont pas la même teneur en glucides comme le montre le Tableau IV.

TABLEAU IV.
*Action de l'acide trichloracétique à 12 p. 100
sur les substances solubles totales.*

	Composition des substances solubles totales p. 100	Répartition après traitement par 12 p. 100 d'acide trichloracétique (p. 100 du total)	
		Surnageant	Précipité
Azote.....	10	56	44
Phosphore	0,36	57	43
Osamine	2,5	92	8
Ose	2,2	80	20
Acide sialique ..	4,0	92	8

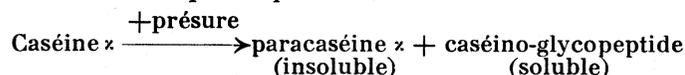
On voit que la fraction soluble dans l'acide trichloracétique est fortement enrichie en sucres ; par contre, le phosphore se répartit presque également dans les deux parties. Il ne s'agit pas simplement d'un phénomène de solubilité.

Le constituant S_1 , séparé par électrophorèse ou par chromatographie des substances solubles totales, représente le caséino-glycopeptide obtenu d'une nouvelle manière, sans intervention de l'acide trichloracétique. Etant donné qu'il forme 80 à 90 p. 100 des substances solubles et en considérant l'ensemble de résultats exposés dans ces deux mémoires et les résultats antérieurs [1, 2, 10] il ne peut faire de doute qu'il est produit au cours de la réaction spécifique de la présure sur la caséine α , par coupure d'une liaison de covalence.

Les constituants mineurs sont des peptides neutres ou basiques dépourvus de phosphore, d'osamine et d'acide sialique. Une partie, au moins, de la fraction S_2 (neutre) est formée aux dépens du caséino-glycopeptide (S_1) qui est une substance labile, pouvant être dégradée dans les conditions expérimentales. Par contre, les peptides basiques ne peuvent avoir la même origine, car ils ont une composition en acides aminés différente de celle de S_1 .

Les constituants mineurs qui accompagnent le caséino-glycopeptide, en faibles proportions, ne résultent probablement pas directement de la réaction envisagée, comme nous l'avons écrit dans le précédent mémoire. Il pourrait s'agir de fractions peptidiques qui ne seraient pas liées à la molécule de caséine α par des liaisons de covalence. Le fait que l'urée, employée au cours de la préparation de la caséine α , respecte ces liaisons et que, par contre, l'acide acétique peut les rompre, suggère des liaisons du type ionique. Au cours de l'action de la présure, après la séparation du caséino-glycopeptide provoquant un déséquilibre ionique, ces peptides seraient libérés.

Nous considérons maintenant que la réaction enzymatique est représentée correctement par l'équation :



Le caséino-glycopeptide a été purifié de deux manières, par fractionnement à l'acide trichloracétique [2] et par chromatographie. Les produits obtenus sont presque identiques par leur composition en acides aminés ; ils contiennent les mêmes glucides, mais en proportions différentes. Le caséino-glycopeptide chromatographique contient moins de glucides et de phosphore que l'autre. Il n'est pas impossible que le passage sur colonne d'échangeur d'ions (DEAE-cellulose) soit en partie responsable de cette différence. Nous avons précédemment montré que les résines Dowex 50 et Dowex 2, modifient le caséino-glycopeptide en libérant du phosphore, des osamines et de l'acide sialique [10].

On ne peut écarter un fractionnement provoqué par l'acide trichloracétique ; il faudrait alors admettre que le produit soluble initial est un mélange de plusieurs formes moléculaires, plus ou moins riches

en glucides, donc plus ou moins solubles dans l'acide trichloracétique. A l'origine il y aurait plusieurs espèces de caséine κ , (l'hypothèse de variants génétiques n'est pas à exclure, comme cela a été démontré pour les autres caséines α S, β et γ).

Ce travail a bénéficié d'une subvention du Ministère de l'Agriculture des Etats-Unis (Grant FG-FR-112, U.S. Public Law 480).

RÉSUMÉ.

Le caséino-glycopeptide est la seule substance soluble formée au cours de la réaction de la présure sur la caséine κ , par coupure d'une liaison de covalence. L'un des trois constituants électrophorétiques mineurs décelés résulte de la dégradation du caséino-glycopeptide ; les deux autres ont une composition bien différente ; ce sont des peptides basiques, non phosphorés, probablement liés à la caséine par des liaisons secondaires.

Le caséino-glycopeptide peut être séparé par chromatographie sur DEAE-cellulose, sans intervention de l'acide trichloracétique ; il a la même composition en acides aminés que le caséino-glycopeptide précédemment étudié, mais il contient moins de glucides et de phosphore.

SUMMARY.

Caseino-glycopeptide is the soluble product formed during the reaction of rennin on κ -casein by splitting of a covalent bond. One of the three minor electrophoretic components is a degradation product of caseino-glycopeptide ; the two others have a very different composition ; they are basic peptides probably linked to κ -casein by secondary bounds.

The caseino-glycopeptide can be obtained by chromatography on DEAE-cellulose, without trichloroacetic acid treatment ; it has the same amino acid composition as the previously studied caseino-glycopeptide, but it contains less glucides and phosphorus.

ZUSAMMENFASSUNG.

Das Caseino-Glycopeptid ist die einzige lösliche Substanz, die im Laufe der Reaktion des Labferments auf das Casein κ durch Bruch einer Covalenzbindung gebildet wird. Einer der drei weniger bedeutenden nachgewiesenen elektrophoretischen Bestandteile kommt von dem Abbau des Glycopeptids her ; die beiden anderen haben eine sehr verschiedene Zusammensetzung ; es sind basische, phosphorlose Peptide, die wahrscheinlich mit dem Casein κ durch sekundäre Bindungen gebunden sind.

Das Caseino-Glycopeptid kann chromatographisch auf DEAE-Cellulose, ohne Eingriff der Trichloressigsäure, getrennt werden ; es besitzt dieselbe Zusammensetzung an Aminosäuren als das vorher untersuchte Caseino-Glycopeptid, aber es enthält weniger Kohlehydrate und Phosphor.

4. RONDLE, C. J. et MORGAN, W. T. J. — *Biochem. J.*, 1955, 61, 586.
5. SCHULTZE, H. E., SCHMIEDTBERGER, R. et HAUPT, H. — *Biochem. Z.*, 1958, 329, 490.
6. WARREN, L. — *J. Biol. Chem.*, 1959, 234, 1971.
7. PIEZ, K. A. et MORRIS, L. — *Anal. Biochem.*, 1960, 1, 187.
8. JOLLÈS, P., ALAIS, C. et JOLLÈS, J. — *Arch. Biochem. Biophys.*, 1962, 98, 56.
9. JOLLÈS, P., ALAIS, C. et JOLLÈS, J. — *Biochim. Biophys. Acta*, 1963, 69, 511.
10. ALAIS, C. — Thèse, Paris, 1962.